

15 Stanovení ftalátů v gumových hračkách

Teoretický úvod

Během života jsou lidé vystaveni působení bezpočtu chemických látek. Obzvláště malé děti přichází do kontaktu s cizorodými látkami velice často, jelikož zkoumají svět všemi smysly. Mezi nejčastější případy výskytu potenciálně nebezpečných látek se řadí prach, nečistoty a látky uvolňující se z pokojového vybavení, stěn či hraček.

Možnosti vzorkování

Látky uvolněné z hraček se mohou do lidského organismu dostat mnoha způsoby.

Jakými způsoby expozice mohou být vystaveny malé děti při kontaktu s hračkami?

V laboratorní úloze se budeme zabývat pouze dermální expozicí. Vzorkovány budou stěry z rukou a povrch hraček. Stěry mohou být suché i mokré, zaměříme se na mokrou variantu pomocí použití 2-propanolu naneseného na papírové utěrky, které nám poslouží jako blank.

Co je to blank a kdy se používá? Stanovili byste jeden blank pro veškeré testování nebo pro každou skupinu vzorků zvlášť? Svou volbu zdůvodněte.

Endokrinní disruptory

Za endokrinní disruptor (ED) můžeme podle stanovených kritérií americkou agenturou pro ochranu životního prostředí (EPA) považovat látku či směs látek, které mohou zasahovat do syntézy, sekrece, transportu, vazby nebo eliminace přirozených hormonů v organismu, jež udržují nezbytnou homeostázu, správné funkce reprodukce, vývoje nebo chování (Kabir et al., 2015).

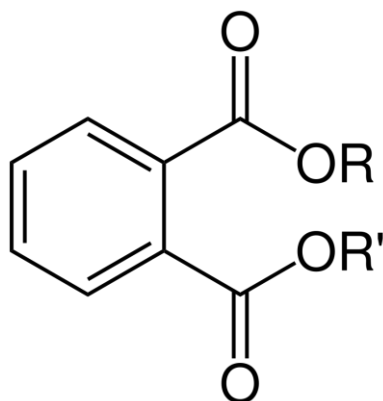
Jak byste definovali ED vlastními slovy?

Endokrinní disruptory mohou být jak přírodního původu (např. fytoestrogeny), tak i uměle vytvořené. Mezi nejpoužívanější syntetické zástupce se řadí pesticidy (chlorpyrifos, DDT), farmaceutika (diethylstilbestrol, paracetamol), plasty (bisfenol A), změkčovadla (ftaláty) a mnohé další (Kumar et al., 2020).

Proč jsou ED (z hlediska mechanismu) pro člověka nebezpečné?

Ftaláty

Termín ftalát se zavedl pro skupinu látek odvozených od 1,2-benzendikarboxylové kyseliny, které jsou substituované dialkylem nebo alkylarylesterem, struktura je uvedena na Obrázku 1 (Pérez-Fernández et al., 2013). Ftaláty jsou široce používány v mnoha produktech osobní péče, kosmetice a také plastech (změkčování produktů vyrobených těmito materiály, zejména vinylových plastů), nátěrech papíru, barvách a lepidlech (S. Saeidnia, in Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), 2014).



Obrázek 1: Obecná chemická struktura ftalátů (R a R' = C_nH_{2n+1}; n = 4–15)

Ftaláty nejsou k plastům vázány kovalentní vazbou, proto může dojít k určitému vyluhování, zejména teplem nebo rozpouštědly. Nejpoužívanějšími zástupci jsou di(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP), diisodecylftalát a diisononylftalát. DEHP se nejčastěji používá při měkčení polyvinylchloridu (PVC) (Darbre et al., 2015).

V jakých matricích ŽP se budou ftaláty vyskytovat nejvíce a proč?

Ftaláty patří do skupiny estrogenních a antiandrogenních látek, u nichž studie prokázaly negativní vliv na vývoj mužského reprodukčního systému (Knez, 2013; Lacouture et al, 2022), dále společně s jejich metabolity potlačují expresi steroidogenních enzymů (Moody et al., 2013) a snižují hladinu testosteronu, FSH a LH (De Falco et al., 2015).

Jak byste definovali steroidogenní enzymy?

Nové nařízení REACH z roku 2018 (s účinností od 2020) rozšířilo přidáním di-isobutylftalátu (DIBP) přílohu XVII (omezení výroby, uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek, směsí a předmětů). Nařízení dříve omezovalo přítomnost ftalátů v hračkách a v produktech péče o děti. Nyní se Bis(2-ethylhexyl)-ftalát (DEHP), Dibutylftalát (DBP), Benzylbutyl-ftalát (BBP) a diisobutyl-ftalát nesmí používat a uvádět na trh obecně v měkčených plastových materiálech (např. PVC, PVDC, PVA, nátěry, lepidla, barvy aj.), hračkách a předmětech pro péči o děti v koncentraci rovné nebo vyšší 0,1 % hmotnostních s výjimkou předmětů, kterých se dotýkají jiná nařízení, jako jsou např. zdravotnické prostředky, předměty pro průmyslové a zemědělské použití nepřicházející do dlouhodobého styku s kůží a sliznicí, elektronická a laboratorní zařízení, materiály a předměty určené pro styk s potravinami atd.

Realizace laboratorní úlohy

Úloha má tři otestované možnosti realizace v závislosti na výběru zástupců reprezentující různé skupiny hraček, se kterými mohou přijít děti do kontaktu. Prvním vzorkem je současně prodejná hračka v podobě gumové kačenky, druhým hračka pro psy v podobě pískacího vinylového míčku a třetí vzorek zastupuje starší hračky předávané v rodinách po generacích. Pro všechny vzorky byla testována dermální expozice.

Otázky k zamyšlení po absolvování praktika

Budou se lišit koncentrace ftalátů u novodobé hračky, hračky pro domácí mazlíčky či retro hračky? Zdůvodněte.

I. Blanky

Pomůcky:

- papírové utěrky na jemné povrchy KIMTECH Science
- alobal
- skleněné kolony
- nerezová chemická lžice

Chemikálie:

- 2-propanol

Postup práce:

- pracovní plochu vyčistěte pomocí ethanolu a položte na ni plát alobalu
- na alobal přichystejte dva kusy papírových utěrek
- na papírové utěrky naneste 2-propanol a vložte je do připravených skleněných kolon
- vzorek zatlačte na dno kolony pomocí nerezové lžice



Obrázek 2: Blanky

II. Stěry z hračky

Pomůcky:

- testovaná hračka
- alobal
- utěrky na jemné povrchy KIMTECH Science
- skleněné extrakční patrony
- nerezová chemická lžice
- časomíra
- fix na popsání vzorků

Chemikálie:

- 2-propanol
- voda
- destilovaná voda

Postup práce:

- připravte si pracovní plochu:

- na plát alobalu umístěte skleněné kolony pro každý popsany vzorek a nerezovou lžíci na zastrčení vzorku do kolony
- na druhý plát alobalu položte dva kusy papírových utěrek, na které před testováním naneste 2-propanol
- před testováním si důkladně umyjte dlaně i hřbety rukou vodou, 2-propanolem a destilovanou vodou
- testovanou hračku 10 minut intenzivně mněte v rukou ze všech stran a úhlů
- po uplynutí časového limitu důkladně setřete povrch hračky předem připravenými 2 kusy papírových utěrek s naneseným 2-propanolem (Obrázek 3) a vzorek přeneste do extrakčních patron



Obrázek 3: Setření povrchu ze všech stran

III. Dermální stěry

Pomůcky:

- testovaná hračka
- alobal
- utěrky na jemné povrchy KIMTECH Science
- skleněné extrakční patrony
- kovová chemická lžíce
- stopky
- fix na popsání vzorků

Chemikálie:

- 2-propanol
- voda
- destilovaná voda

Postup práce:

- předpřipravte si pracovní plochu:
 - na plát alobalu položte dva kusy papírových utěrek, na které před testováním naneste 2-propanol
 - na druhý plát alobalu umístěte skleněné kolony pro každý popsany vzorek a nerezovou lžíci na zastrčení vzorku do kolony
 - nezapomeňte, že po dezinfekci rukou se již ničeho kromě vzorků nedotýkáte, abyste předešli kontaminaci vzorků
- před testováním si důkladně umyjte dlaně i hřbety rukou vodou, 2-propanolem a destilovanou vodou

- testovanou hračku 10 minut intenzivně mněte v rukou ze všech stran a úhlů (Obrázek 4)
- po uplynutí časového limitu důkladně setřete povrch rukou (dlaně i hřbety rukou) předem připravenými 2 kusy papírových utěrek s naneseným 2-propanolem a vzorek přeneste do extrakčních patron (Obrázky 5 a 6)



Obrázek 4: Mnutí hračky ze všech stran



Obrázek 5: Setření dlaní i hřbetů rukou



Obrázek 6: Vzorky v extrakčních patronách

IV. Extrakce papírových utěrek

Pomůcky:

- UniversalExtractor E-800 BUCHI
- skleněné extrakční patrony
- automatická pipeta se špičkou
- varné kamínky
- kádinky
- Pasteurova skleněná pipeta
- balónek
- vialky o objemu 40 ml
- stojánek na vialky
- nalepovací popisky
- popisovací fix

Chemikálie:

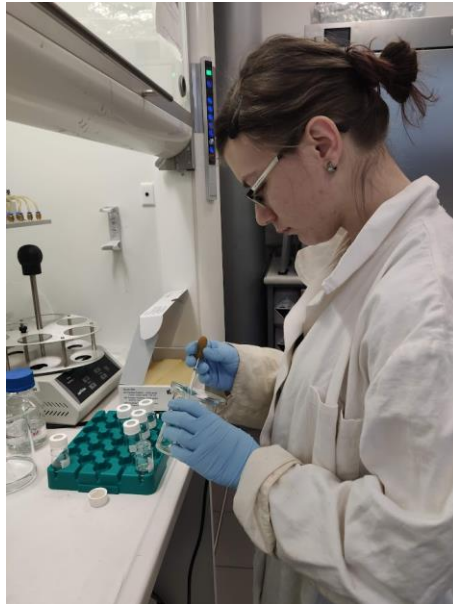
- dichlormethan (dále DCM)
- standard D-PTHT MIX (DEHP, BBZP a DEP v poměru 1:1:1 o koncentraci 4 µg/ml)

Postup práce:

- před samotnou analýzou promyjte extraktor DCM v délce tří extrakčních cyklů
- do skleněných extrakčních patron s papírovými utěrkami naneste automatickou pipetou 50 µl standardu D-PTHT MIX
- spusťte extrakci (Obrázek 7) na automatickém extraktoru Buchi E-800 horkým DCM a varnými kamínky (40 minut extrakce, 20 minut prokapávání a 25 minut sušení)
- kvantitativně převedte objem kádinky s varnými kamínky do předem popsanych vialek pomocí Pasteurovy pipety (Obrázek 8)
- každou kádinku 2x promyjte DCM (kvantitativní převedení)



Obrázek 7: Extrakce vzorku



Obrázek 8: Kvantitativní převedení objemu kádinky do vialek

V. Čištění vzorků

Pomůcky:

- ochrana dýchacího ústrojí (respirátor)
- alobal
- stojan na kolony
- skleněné kolony
- násypka
- kovová jehlice
- chemická lžička
- popisovací fix
- vialky 40 ml, 20 ml, 1 ml
- Pasteurova skleněná pipeta
- balónek
- UniversalExtractor E-800 BUCHI
- Digital Dry Bath (koncentrátor)
- automatická pipeta se špičkou
- sklopná pipeta 10 ml, 20 ml

Chemikálie:

- aktivovaný silikagel (8 h v Soxhletově extraktoru s DCM, 5 h pečení v troubě na 120 °C)
- aktivovaný síran sodný
- vyčištěná vata (8 h v Soxhletově extraktoru s DCM)
- hexan
- nonan
- standard D-PTHT MIX (DEHP, BBZP a DEP v poměru 1:1:1 o koncentraci 4 µg/ml)
- p-terphenyl

Jaké nebezpečí by vám hrozilo, kdybyste si při práci se silikagelem zapomněli nasadit respirátor?

Proč je nutné uchovávat vychlazený aktivovaný silikagel v exikátoru namísto digestoře?

Proč byla vyčištěná vata cíleně uchována v alobalu?

Postup práce:

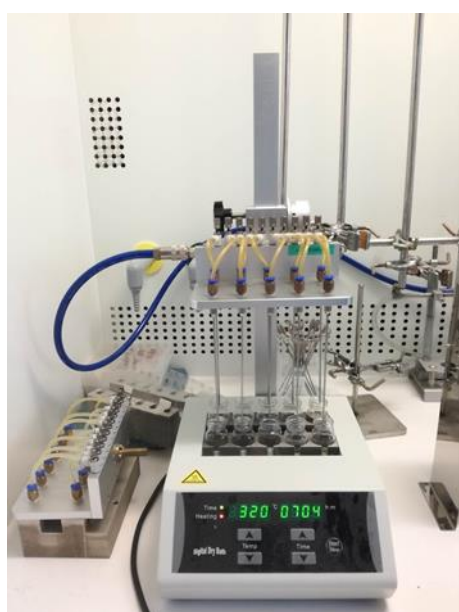
- při práci se silikagelem si zakryjte dýchací ústrojí respirátorem
- připravte si předem aktivovaný silikagel a vyčištěnou vatu
- vychlazený aktivovaný silikagel přesypejte do skleněné nádoby (Obrázek 9) a uchovejte v exikátoru pro další použití
- v digestoři si postavte stojan na kolony, do kolon ve stojanu dejte malé množství vyčištěné vaty (cca 1 cm²), pomocí násypky přidejte cca 5 g aktivovaného silikagelu (5 zarovnaných chemických lžic) a malou zarovnanou lžičku aktivovaného síranu sodného
- kolony lehce sklepejte popisovacím fixem pro usnadnění čištění a pod kolony přidejte popsané vialky o objemu 40 ml (Obrázek 10)
- do kolon naneste pomocí Pasteurovy pipety předem zhuštěný vzorek z koncentrátoru Digital Dry Bath (Obrázek 11 a) a 2x kvantitativně promyjte hexanem (Obrázek 12 a)
- přilijte do kolony 10 ml hexanu a 20 ml DCM pomocí sklopných pipet
- po odkapání naneste na vzorek 50 µl nonanu a zhuštěte vzorek při 32 °C na koncentrátoru na objem 0,5 ml (Obrázek 11 b)
- zhuštěné vzorky převeděte do minivialek pomocí Pasteurovy pipety
- 2x kvantitativně promyjte obsah vialek 350 µl hexanu nanášeného pomocí automatické pipety (Obrázek 12 b) a vzorek přeneste do popsaných minivialek (Obrázek 13)
- obsah minivialek zhuštěte na objem 50 µl (Obrázek 14)
- do tří minivialek pro standard přidejte 50 µl standardu D-PTHT MIX
- do všech vzorků přidejte 50 µl interního standardu p-terphenyl



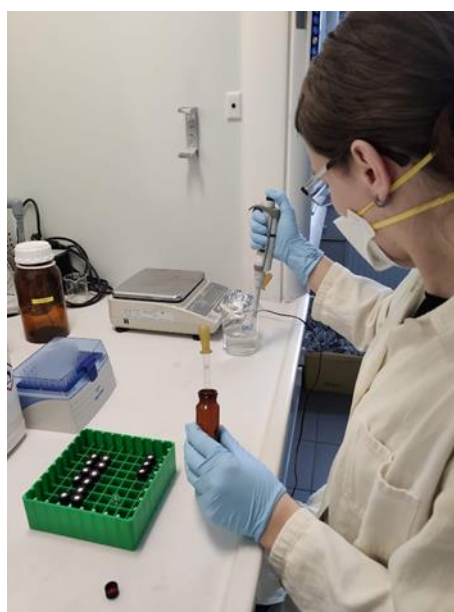
Obrázek 9: Přesypání silikagelu do skleněné nádoby



Obrázek 10: Kolony s předchystanými vzorky k čištění



Obrázky 11 a, b: Zhušřování vzorků v koncentrátoru Digital Dry Bath



Obrázky 12 a, b: Kvantitativní převedení vzorku hexanem



Obrázek 13: Převodění zhuštěných vzorků do minivialek pomocí pasterovy pipety



Obrázek 14: Zahuštění vzorku v minivialekách